

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Anna Šipková**

**Alkohol dehydrogenázy parazitických protist**  
Alcohol dehydrogenases in parasitic protists

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jan Mach, Ph.D.

Praha, 2019

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá přehledem alkohol dehydrogenáz u parazitických protist. Tyto enzymy se nacházející v širokém spektru organismů od bakterií až po člověka. Díky různorodosti struktur těchto enzymů je substrátová specifita široká a jejich funkce různá. Modelová Adh1 *Saccharomyces cerevisiae* je například tetramerní enzym s navázanými katalytickými ionty zinku. Základní funkcí je reverzibilní katalýza oxidace alkoholů na aldehydy a ketony za současné redukce koenzymu, kterým je NADP<sup>+</sup> nebo NAD<sup>+</sup>. U většiny organismů se Adh nachází ve více typech. Na základě současných přístupů je klasifikace Adh velmi obtížná a není ještě přesně stanovena. Současná klasifikace je do tří základních skupin: MDR („středně dlouhé“ Adh), SDR („krátké“ Adh) a železné Adh. Specifické zastoupení a funkce Adh je u parazitických protist, které využívají Adh především kvůli flexibilitě metabolismu, a tedy i k přizpůsobení na prostředí hostitele. V této práci se zabývám především parazity vyskytujícími se v anaerobním prostředí, kde Adh figurují ve fermentativních metabolických drahách. Důležitou roli mají Adh i při rezistenci na určitá léčiva, jak tomu je například u parazita *Trypanosoma cruzi* nebo *Tritrichomonas foetus*. V posledních letech byla Adh intenzivně zkoumána a stala se perspektivním enzymem pro využití například ve farmaceutickém a chemickém průmyslu.

**Klíčová slova:** Alkohol dehydrogenáza, klasifikace, parazitická protista, rezistence

## ABSTRACT

Bachelor's thesis summarizes alcohol dehydrogenases mainly in parasitic protists. These widespread enzymes have been identified in several organisms ranging from bacteria to human. Thanks to the diversity of the enzyme's structure and substrate specificity is its function variable. Structure of the model zinc-containing Adh1 *Saccharomyces cerevisiae* is tetrameric. Enzymes are responsible for reversible oxidation of alcohols to aldehydes or ketones with concomitant reduction of  $\text{NAD(P)}^+$  as a cofactor. In most organisms, Adh appears in several types. Classification of Adhs is quite difficult and incomplete due to the investigation progress. The current classification includes three groups: MDR („medium chain“ Adh), SDR („small chain“ Adh) and iron-containing Adh. Adhs in parasitic protists have a specific role in the flexibility of metabolism and the adaptability to environmental changes in the host. This thesis deals especially with anaerobic parasites, where Adh is important in fermentation metabolism. Adh also figures in the resistance to drugs like in *Trypanosoma cruzi* or *Tritrichomonas foetus*. Recently, Adh has become a promising enzyme for a biotechnological application like in pharmaceutical or chemical industry.

**Keywords:** Alcohol dehydrogenases, classification, parasitic protists, resistance

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli RNDr. Janu Machovi, Ph.D. za trpělivost, odborné rady a vstřícnost, kterou mi poskytoval v průběhu tvorby této práce. Dále bych ráda poděkovala celé laboratoři RNDr. Róberta Šut'áka Ph.D. za zkušenosti a také celé své rodině za veškerou podporu.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5. 2019

Anna Šipková

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Adh	Alkohol dehydrogenáza
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
Cad	Cinnamyl alkohol dehydrogenáza
CAdh	Alkohol dehydrogenáza <i>Cryptosporidium</i>
CoA	Koenzym A
EhAdh	Alkohol dehydrogenáza <i>Entamoeba histolytica</i>
Fadh	Glutathion-dependentní formaldehyd dehydrogenáza
FeAdh	Železná alkohol dehydrogenáza
GIAdh3	Alkohol dehydrogenáza <i>Giardia intestinalis</i>
MDR	Středně dlouhé alkohol dehydrogenáza, „Medium chain“,
NAD <sup>+</sup>	Oxidovaná forma nikotinadenindinukleotidu
NADP <sup>+</sup>	Oxidovaná forma nikotinadenindinukleotid fosfátu
NADH	Redukovaná forma nikotinadenindinukleotidu
NADPH	Redukovaná forma nikotinadenindinukleotid fosfátu
NCBI	„National Center of Biotechnology Information“
ScAdh	Alkohol dehydrogenáza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDR	Krátké alkohol dehydrogenázy, „Short chain“
Tadh	Tetramerní alkohol dehydrogenáza
TcAdh	Alkohol dehydrogenáza <i>Trypanosoma cruzi</i>
Tv-S-Adh	Sekundární alkohol dehydrogenáza <i>Trichomonas vaginalis</i>
Tf-S-Adh	Sekundární dehydrogenáza <i>Tritrichomonas foetus</i>
TFE	Trifluoroethanol

## OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1 FUNKCE A STRUKTURA ALKOHOL DEHYDROGENÁSY (ADH).....</b>	<b>2</b>
1.1 FUNKCE ADH U MODELOVÉHO ORGANISMU <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	2
1.2 REDOXNÍ ČLUNEK U <i>S. CEREVISIAE</i> .....	3
1.3 STRUKTURA ALKOHOL DEHYDROGENÁZY <i>S. CEREVISIAE</i> (SCADH1).....	4
1.4 TETRAHEDRÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ ZINKU SCADH1 .....	5
1.5 VAZBA SUBSTRÁTU SCADH1 .....	6
1.6 KOENZYM SCADH1 .....	6
1.7 AKTIVNÍ CENTRA SCADH1 .....	7
<b>2 KLASIFIKACE ADH .....</b>	<b>7</b>
2.1 KLASIFIKACE ADH <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	8
2.2 SOUČASNÁ KLASIFIKACE NAD(P)-DEPENDENTNÍCH ADH .....	9
2.2.1 MDR skupina .....	9
2.2.2 SDR skupina.....	10
2.2.3 Železo dependentní ADH.....	11
<b>3 PARAZITICKÁ PROTISTA A JEJICH ADH .....</b>	<b>12</b>
3.1 <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> .....	12
3.2 <i>NAEGLERIA GRUBERI/FOWLERI</i> .....	14
3.3 <i>ENTAMOEBA HISTOLYTICA</i> .....	17
3.4 <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> .....	18
3.5 <i>GIARDIA INTESTINALIS</i> .....	20
3.6 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	20
<b>4 BIOTECHNOLOGIE .....</b>	<b>21</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>21</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>23</b>

## ÚVOD

Alkohol dehydrogenázy (Adh) jsou enzymy katalyzující přeměnu alkoholu na aldehyd nebo keton v reverzibilním směru a současně redukují  $\text{NAD(P)}^+$ , který je koenzymem pro tento enzym. Jedná se tedy o oxidoreduktázy, které jsou využívány v širokém okruhu metabolických aktivit u různých typů organismů. Byly nalezeny jak v protozoálních, tak eukaryotických organismech a v člověku. Substrátem těchto enzymů jsou primární i sekundární alifatické, větvené a aromatické alkoholy a k nim odpovídající aldehydy a ketony (Reid a Fewson, 1994). Základní fyziologickou úlohou Adh je metabolismus etanolu. U většiny organismů se vyskytuje více typů Adh tzv. izoenzymů, které mají širokou substrátovou specifitu. Jejich výzkum je značně komplikovaný, protože podle primární sekvence je v podstatě nemožné určit fyziologické vlastnosti jednotlivých izoenzymů Adh (Ismail et al., 1993). Proto se používají nové přístupy, jako například výzkum funkce určitých proteinů pomocí klonů se zvýšenou expresí kódujících genů.

V současné době se Adh dělí podle typu koenzymu na  $\text{NAD(P)}$ -nezávislé Adh, které využívají například pyrrolochinolin chinon, jako koenzym, tímto typem Adh se v této práci nezabývám. Popisovány jsou zde enzymy druhého typu  $\text{NAD(P)}$ -dependentních Adh (Reid a Fewson, 1994), které se dělí na tři skupiny: MDR, enzymy se středně dlouhými podjednotkami (~350 aminokyselin) obsahující ve své struktuře atomy zinku, SDR, enzymy s kratšími podjednotkami (~250 aminokyselin) (Jörnvall et al., 2013) a třetí skupina enzymů zvaných železné Adh (FeAdh), které ve své struktuře obsahují atomy železa nebo dalších atomů kovu (Gaona-López et al., 2016). Tato práce se zabývá pouze  $\text{NAD(P)}$ -dependentními Adh.

V předkládané práci jsem použila pro popis základní funkce a struktury Adh modelový organismus *Saccharomyces cerevisiae*, který je díky krátkému životnímu cyklu a dostupnosti těchto buněk ideální pro výzkum. Tento organismus ve svém metabolismu využívá nejspíše 7 izoenzymů ScAdh (De Smidt et al., 2008).

Specifické alkohol dehydrogenázy byly objeveny také u parazitických protist, které tyto enzymy často využívají k flexibilní funkci jejich metabolických drah v případě změny prostředí v hostiteli, ve kterém se nacházejí. V této práci jsem shrnula informace o Adh u *T. vaginalis*, *T. foetus*, *N. gruberi*, *G. intestinalis*, *E. histolytica*, *Cryptosporidium* a *T. cruzi*.

Anaerobní organismus *Trichomonas vaginalis* využívá sekundární alkohol dehydrogenázu (Tv-S-Adh), katalyzující přeměnu ketonů především na sekundární alkohol 2-propanol. Při změně prostředí v hostiteli dokáže upravit metabolické dráhy a změnit koncový produkt

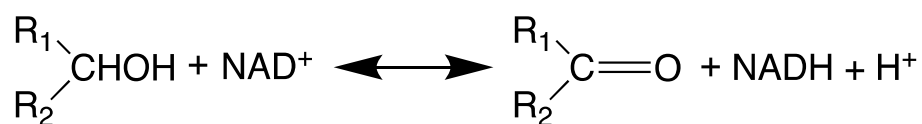
hydrogenosomů. Tato změna metabolických drah udržuje cytosolickou redoxní rovnováhu a také zvyšuje schopnost adaptace parazita v měnícím se prostředí hostitele (Šut'ák et al., 2012). Železná Adh byla nalezena u rodu *Naegleria*, podrobněji byla zkoumána u nepatogenní *Naegleria gruberi*, tato FeAdh je pravděpodobně lokalizována v mitochondriích. Předpokládá se, že je využívána k flexibilitě metabolismu mitochondrie, který by umožňoval organismu žít jak v aerobním, tak anaerobním prostředí, tento mechanismus se ale nepodařilo prokázat (Opperdoes et al., 2011).

Důležitou roli mají Adh u střevních parazitů jako jsou *Entamoeba histolytica* nebo *Cryptosporidium*. Tito parazité se nacházejí v trávicím traktu hostitele, kde jsou vystavováni změnám prostředí, dochází zde ke změnám koncentrace glukózy a pH, čemuž se musí organismy rychle přizpůsobit. Energetický metabolismus těchto parazitů je založen především na fermentativní glykolýze, které se také účastní specifické alkohol dehydrogenázy (Saavedra et al., 2019, Cacciò a Widmer, 2013).

V posledním desetiletí se Adh staly zajímavým cílem výzkumu. Byly charakterizovány další druhy Adh a postupně se začaly využívat i v biotechnologiích, pro biosyntézu léčiv a chemikálií (Zheng et al., 2017).

## 1 FUNKCE A STRUKTURA ALKOHOL DEHYDROGENÁSY (ADH)

Adh byly nalezeny u mnoha organismů jak eukaryotických, tak prokaryotických, Adh zastávají více funkcí v různých metabolických procesech. Tento enzym tvoří širokou skupinu enzymů typu oxidoreduktáz, které jsou schopny katalyzovat reverzibilní oxidaci alkoholu na aldehyd nebo keton, za současné redukce koenzymu  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{NADP}^+$ , obecná reakce zobrazena na obrázku 1.



Obrázek 1. reverzibilní redoxní reakce katalyzována alkohol dehydrogenázou (Leskovac et al., 2002)

### 1.1 Funkce Adh u modelového organismu *Saccharomyces cerevisiae*

V minulém století byly ve vysoké míře prováděny biochemické analýzy Adh *S. cerevisiae* (ScAdh) především díky snadné dostupnosti těchto buněk, proto byla ScAdh jako první



izolována a krystalizována již v roce 1937 (Negelein a Wulff, 1937). Z fyziologického hlediska, ScAdh a Adh u dalších příbuzných organismů mají důležitou roli především v dráze metabolismu cukrů (Ciriacy, 1997).

Redukční reakce katalyzované Adh vedou k produkci alkoholu a oxidaci koenzymu (NADH na  $\text{NAD}^+$  nebo NADPH na  $\text{NADP}^+$ ), k čemuž dochází při fermentaci u *S. cerevisiae* a také anaerobních bakterií (Clark, 1989). Nezbytnou rolí u *S. cerevisiae* je regenerace molekuly  $\text{NAD}^+$ . Tato molekula je využívána v dalších metabolických drahách především jako nositel redoxních ekvivalentů. Zastává funkci koenzymu pro další enzymy katalyzující oxidoredukční reakce (Kato a Lin, 2014), jako například u citrátového cyklu. Alkohol produkovaný Adh může být také zdrojem uhlíku pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a tuků.

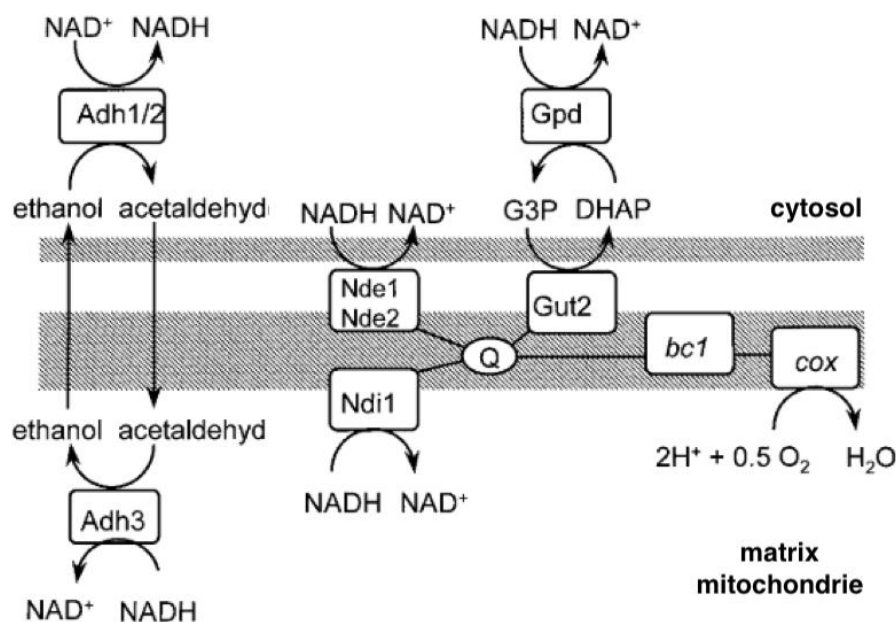
Oxidací alkoholů dochází k produkci aldehydů a ketonů za redukce koenzymu (NADH na  $\text{NAD}^+$  nebo NADPH na  $\text{NADP}^+$ ), redukované koenzymy jsou opět využívány jako nositelé redoxních ekvivalentů (Reid a Fewson, 1994).

## 1.2 Redoxní člunek u *S. cerevisiae*

V anaerobním prostředí využívá *S. cerevisiae* zajímavý mechanismus transportu NADH z mitochondrie do cytosolu. Tento mechanismus je nutný pro transport redoxních ekvivalentů NADH, které nemohou volně procházet membránami mitochondrií (Von Jagow a Klingenberg, 1970) a hromadí se v mitochondriích (Nissen et al., 1997). Jedná se o ethanol-acetaldehydový člunek, který zajišťují mitochondriální a cytosolické izoenzymy ScAdh (Von Jagow a Klingenberg, 1970). Tento transport je zajištěn volným průchodem ethanolu a acetaldehydu membránami mitochondrie. V matrix mitochondrie se nachází jeden izoenzym ScAdh3, který katalyzuje přeměnu acetaldehydu na ethanol za oxidace NADH na  $\text{NAD}^+$ . Na cytosolické straně katalyzují přeměnu ethanolu na acetaldehyd izoenzymy ScAdh1 a ScAdh2, za současné redukce  $\text{NAD}^+$  na NADH (Bakker et al., 2000).

*S. cerevisiae* postrádá typický komplex I v dýchacím řetězci, který u většiny aerobních eukaryot oxiduje NADH v mitochondriích a vytváří protonový gradient. Pomocí NADH ubichinon oxidoreduktázy, také zvané jako NADH dehydrogenáza, je zajištěna oxidace NADH, ale nejedná se o protonové pumpy. Tento enzym je lokalizován ve vnitřní membráně mitochondrie s aktivní stranou směřující do matrix mitochondrie (Marres et al., 1991). *S. cerevisiae* má další dvě NADH dehydrogenázy, které jsou lokalizovány také na vnitřní membráně mitochondrie (Nde1, Nde2), ale jejich aktivní strana směřuje do cytosolu, kde oxidují cytosolické NADH na  $\text{NAD}^+$ . Oxidace cytosolické NADH, může být spojena také s dýchacím řetězcem skrz glycerol-3-fosfátový člunek (Larsson et al., 1998). Redukované NADH, které bylo

transportováno přes ethanol-acetaldehydový člunek z mitochondrie do cytosolu, může být tedy dále oxidováno pomocí glycerol-3-fosfátového člunku a enzymů Nde1 a Nde2, které jsou součástí dýchacího řetězce, který je využíván při aerobním metabolismu (Bakker et al., 2000). Znázornění tohoto mechanismu je na obrázku 2.

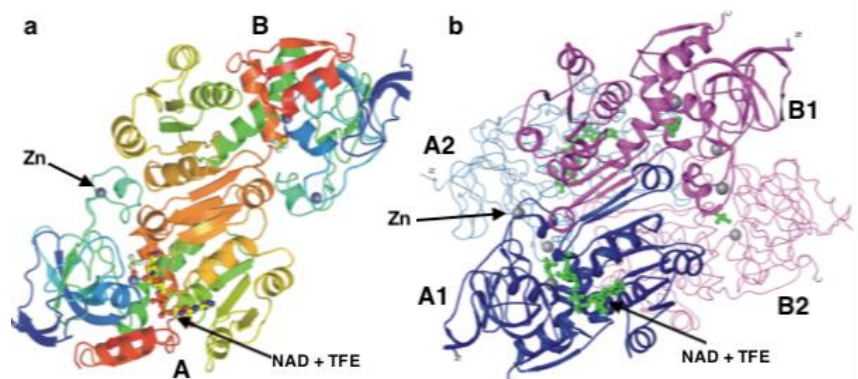


Obrázek 2. Schematické znázornění funkce redoxního člunku (ethanol-acetaldehydového člunku) u *S. cerevisiae*, na levé straně schématu, Adh, alkohol dehydrogenázy. Na pravé straně je znázorněn dýchací řetězec *S. cerevisiae* s alternativním komplexem I složeným ze tří enzymů Ndi1, NADH dehydrogenáza směřující do matrix mitochondrie (interní); Nde, NADH dehydrogenáza směřující do cytosolu (externí), další složky dýchacího řetězce Gut2, glycerol-3-fosfát dehydrogenáza vázána na vnitřní membránu; G3P, glycerol-3-fosfát; DHAP, dihydroxy acetonfosfát; bc1 komplex; cox, cytochrom c oxidáza; Gpd, solubilní glycerol-3-fosfát dehydrogenáza; Q, ubiquinon, podle Bakker et al., 2000.

### 1.3 Struktura alkohol dehydrogenázy *S. cerevisiae* (ScAdh1)

V následující podkapitole se budu zabývat strukturou typické Adh, izoenzymu *S. cerevisiae* ScAdh1. ScAdh1 je typickou cytosolickou zinek vázající Adh katalyzující redukcí acetaldehydu na ethanol během fermentace (Bakker et al., 2000). ScAdh1 je tetramerní izoenzym, složený ze dvou dimerů AB nebo CD, které jsou strukturně podobné. V buňkách se nachází dva rozdílné tetramery, které mají různé složení dimerů AB a CD. Dimery v tetramerech mají tzv. „back to back“ uspořádání A1B1:A2B2, C1D1:C2D2. V tomto složení, mají podjednotky různé funkce. Strukturní funkci a podobnou uzavřenou konformaci mají podjednotky A a C, kam se váže koenzym NAD. Podjednotky B a D mají uzavřenou

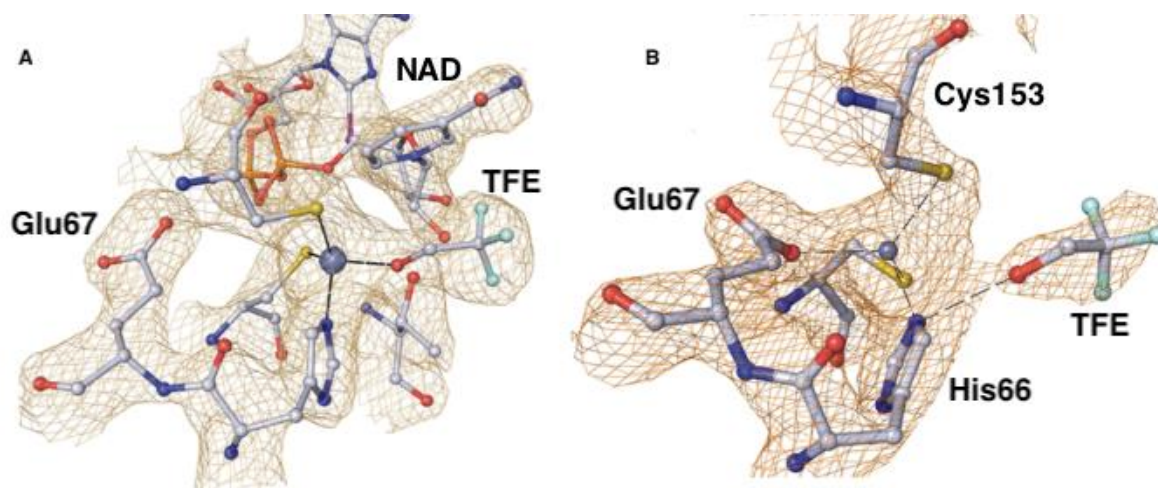
konformaci a koenzym nemají navázán. Dimery jsou si navzájem asymetrické a v tetrameru vznikají dvě konformace, tím je nejspíše zajištěn katalytický mechanismus tohoto enzymu (Raj et al., 2014). ScAdh1 obsahuje v každé podjednotce tetrameru dva atomy zinku s odlišnou funkcí (Reid a Fewson, 1994). Modelový obrázek struktury ScAdh1 znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3. Model asymetrických dimerů A1B1 a složených tetramerů A1B1:A2B2 v tzv. “back to back” uspořádání. (a) A podjednotka je zde v uzavřené konformaci s navázaným NAD a TFE (trifluoroethanol), podjednotka B v otevřené konformaci pouze s navázaným TFE, atomy zinku jsou zde znázorněny šedými kuličkami, (b) tetramerní uspořádání, těsně asociované katalytické podjednotky A1 a A2 (označené modrou barvou) mají navázáno NAD a TFE (zeleně značeno), k nim jsou připojeny podjednotky B1 a B2 (označené růžovou barvou), podle Raj et al., 2014

#### 1.4 Tetrahedrální uspořádání zinku ScAdh1

Atomy zinku zastávají ve struktuře Adh rozličné funkce, například u ScAdh1 je jeden atom zinku důležitý pro udržení kvartérní struktury enzymu (Reid a Fewson, 1994). Druhý atom zinku při alkoholové oxidaci stabilizuje alkoholátový iont při přenosu vodíku v průběhu reverzní katalýzy, zvyšuje elektrofilní charakter aldehydu a usnadňuje přenos vodíkového iontu na aldehyd (Leskovac et al., 2002). Zinek je v tetrahedrální koordinaci a vzdálenosti navázaných substituentů jsou specifické pro jednotlivé typy alkohol dehydrogenáz. U podjednotek A a C jsou v sekundární sféře ScAdh1 vázány katalytický zinek s trifluoroethanolem (TFE) a Glu-67. TFE slouží jako alkoholový substrát, který po navázání do vazebného místa blokuje a stabilizuje ScAdh1, následně je možné z tohoto enzymu vytvořit krystal (Raj et al., 2014). Glu-67 má pravděpodobně funkci ligandu, který se nachází v oblasti vazebného místa substrátu. Pomocí disociace umožňuje navázání alkoholu (Ryde, 1995). Modelové tetrahedrální uspořádání zinku je ukázáno na obrázku 4.



Obrázek 4. Znáznornění dvou rozdílných koordinací katalytického zinku u ScAdh1. (A) klasická koordinace podjednotek A a C s navázaným NAD přes TFE, který je označen šedou kuličkou, (B) alternativní koordinace podjednotek B a D, TFE je zde vázáno přes His-66, Glu-67 je navázána na atom zinku, není zde vazba NAD (Raj et al., 2014).

### 1.5 Vazba substrátu ScAdh1

Substrátová specifita u ScAdh1 je především na nevětvené alifatické primární alkoholy. U větvených alkoholů se efektivita ScAdh snižuje (Leskovac et al., 2002). Dlouhé hydrofobní aminokyseliny jako Trp-54, Trp-92, Met-270 a Tyr-294 vytváří prostor pro navázání ethanolu (Sund et al., 1963). Ethanol je nejlepším substrátem pro izoenzym ScAdh1, na rozdíl například od methanolu, který je ScAdh1 schopna oxidovat na formaldehyd, ale jeho aktivita se pohybuje jen kolem 0,07 % (Leskovac et al., 2002). Aktivita ScAdh1 se snižuje se zvyšující se délkou alkoholu, oproti tomu například u Adh z koňských jater se aktivita zvyšuje s narůstající velikostí alkoholů (Sekhar a Plapp, 1990).

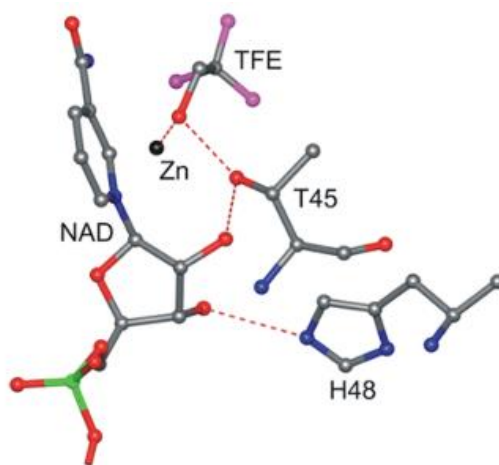
### 1.6 Koenzym ScAdh1

Jak již bylo zmíněno koenzymem pro enzymy Adh jsou molekuly  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{NADP}^+$ , respektive NADH nebo NADPH. Koenzym je vázán na apoenzym čtenými koordinačními vazbami (Leskovac et al., 2002). ScAdh1 váže 4 mol  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{NADP}^+$  a 4 atomy katalytického zinku (Karlović et al., 1976). Koenzymy a zinky jsou vázány na 4 reaktivní cysteiny anebo jsou v jejich blízkosti (Harris, 1964). U  $\text{NAD}^+$  dependentní Adh se v místě vazby koenzymu nachází specifická sekvence GXGXXG s ADP vazebným  $\beta\alpha\beta$ -motivem, tato sekvence spojuje první beta list s prvním alfa helixem, vytváří se těsná smyčka, která napomáhá správnému navázání koenzymu (Wierenga et al., 1986). U ScAdh1 se na konci beta listu  $\beta\alpha\beta$ -motivu nachází konzervovaná asparagová kyselina Asp-201, tvořící vodíkový můstek s kyslíky O2 a O3 NAD, což překáže vazbě NADP (Fan et al., 1991). U  $\text{NADP}^+$  dependentních Adh je

místo konzervované asparagové kyseliny jedna z neutrálních aminokyselin (Val, Gly, Ala, Ser, Thr a Leu) a jedna ze dvou dalších aminokyselin je Arg (Fan a Plapp, 1999).

### 1.7 Aktivní centra ScAdh1

Aktivní centrum enzymu má za úkol vázat molekulu substrátu a molekulu koenzymu a katalyzovat přenos vodíku mezi nimi (Leskovac et al., 2002). Pomocí specifických aminokyselin nacházejících se v primární struktuře enzymu je umožněno navázat substrát a koenzym a katalyzovat reakci (Jörnvall et al., 1978). Monomery enzymu jsou rozděleny do dvou dimerních struktur, které mají každá jinou funkci, koenzym vázající a katalytickou doménu. V aktivním místě enzymu funguje systém přenosu protonů (Leskovac et al., 2002). Hydroxylová skupina alkoholu je navázána na His-48 vodíkovým můstkem s hydroxylovou skupinou Thr-45 a atomem kyslíku O3 NAD. Vazba může přeskakovat na atom kyslíku O2 NAD a dokončit přenos protonu (Raj et al., 2014). Ze struktury je možné usoudit, že Histidin je základem pro oxidaci alkoholu a je schopen přijmout proton do systému přenosu protonu, který ulehčuje tvorbu alkoxydů zinku (Plapp et al., 1991). Tento model struktury je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5. Aktivní centrum podjednotky A, zobrazující systém přenosu protonu, alkohol TFE je navázán na katalytický atom zinku. His-48 tvoří vodíkový můstek s atomem kyslíku O3 nikotinamid ribózy, tato vazba může přeskočit na atom kyslíku O2 nikotinamid ribózy a dokončit systém přenosu protonu, který váže alkohol a His-48. Podle Raj et al., 2014.

## 2 KLASIFIKACE ADH

Díky variabilitě struktury, široké substrátové specifitě, rozdílné lokalizaci a různé funkci v metabolických drahách, je klasifikace velmi obtížná (Jörnvall et al., 2013). Adh mohou být rozděleny podle typu koenzymu na NAD(P)-nezávislé, kde je koenzymem např. pyrrolochinolin chinon a NAD(P)-dependentní, které se podle velikosti a struktury dále dělí na

tři skupiny. MDR skupina („medium-chain“), která zahrnuje zinek dependentní enzymy s podjednotkami dlouhými přibližně 350 aminokyselin. Druhá skupina, SDR („short-chain“), obsahující přibližně 250 aminokyselinové enzymy, které ale jsou na zinek nezávislé a třetí skupina zahrnuje Adh, které používají jako kofaktor atom železa (Reid a Fewson, 1994). Díky zatím neznámým funkcím některých Adh, není klasifikace úplně dokončena.

## 2.1 Klasifikace ADH *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* obsahuje více typů ScAdh tzv. izoenzymů. Izoenzymy lze charakterizovat podle rozdílného chování při potlačení glukózy z okolí enzymu a teplotní stability. Důležitým faktorem je také asociace s mitochondriemi (Fowler et al., 1971). Pomocí genetické analýzy mutantů *adh* byly ScAdh rozděleny do tří tříd izoenzymů, podle rozdílných znaků (Ciriacy, 1975). Genetická analýza mutantů *adh* odhalila čtyři geny na různých chromozomech: jeden lokus pro fermentativní ScAdh1, další lokus pro mitochondriální ScAdh3 a dva lokusy pro ScAdh2, která je potlačována glukózou (Lutstorf a Megnet, 1968). Následné výzkumy objevily další izoenzymy, popsán byl izoenzym ScAdh4 (Drewke a Ciriacy, 1988) ScAdh5 (Feldmann et al., 1994). Izoenzymy ScAdh6 (Larroy et al., 2002a) a ScAdh7 (Larroy et al., 2002b) byly identifikovány později.

Izoenzymy ScAdh1, ScAdh2, ScAdh3 a později objevené ScAdh6 a ScAdh7 spadají do skupiny MDR (Danielsson et al., 1994, Larroy et al., 2002b), u ScAdh4 se předpokládá, že se jedná o železnou Adh (Gaona-López et al., 2016). Díky málo informacím o ScAdh5 se jistě neví, kam tento izoenzym patří, ale díky podobnosti s izoenzymy ScAdh1, ScAdh2 a ScAdh3, se jedná nejspíše o Adh ze skupiny MDR (Feldmann et al., 1994).

Aktivní ScAdh1 obsahuje 4 podobné polypeptidové řetězce se 4 reaktivními místy (Harris, 1964). ScAdh1 je lokalizována v cytosolu, její funkce je ve směru produkce ethanolu v anaerobním prostředí (Bakker et al., 2000). Inaktivace ScAdh1 je způsobena disociací tetramerní struktury na monomery (De Bolle et al., 1995).

Exprese genu *ScADH2* kódující ScAdh2 je potlačována v přítomnosti glukózy (Price, 2003), která je pro *S. cerevisiae* společně s fruktózou zdrojem uhlíku. Při dostatku glukózy není potřeba syntetizovat enzymy využívající alternativní zdroje uhlíku, kam patří i ScAdh2, tedy dochází k tzv. katabolické represi (Gancedo, 1998). ScAdh2 má oproti ScAdh1 vyšší afinitu k ethanolu a podílí se tedy především na spotřebě ethanolu (Ciriacy, 1997).

Izoenzym ScAdh3 má důležitou roli již ve zmíněném redoxním člunku. ScAdh3 je lokalizována jako jediná v mitochondriích *S. cerevisiae* a je důležitá při reoxidaci NADH, za současné přeměny acetaldehydu na ethanol (Bakker et al., 2000).

ScAdh4 je izoenzym ScAdh, který se liší od předchozích tří izoenzymů. Rozdílnost izoenzymu je hlavně ve struktuře, zatímco předešlé tři izoenzymy byly tetramerní, izoenzym ScAdh4 je dimerní. Pro svou funkci ale vyžaduje ionty zinku, jako již zmíněné izoenzymy a exprese tohoto izoenzymu není u *S. cerevisiae* vysoká. Afinita ethanolu, NADH a acetaldehydu izoenzymu ScAdh4 je velmi podobná ScAdh1 (Drewke a Ciriacy, 1988). K vyšší expresi izoenzymu ScAdh4 pravděpodobně dochází při nedostatku iontů zinku, kdy se stává určitou zálohou za ScAdh1 (Yuan, 2000), to je teoreticky umožněno dimerní strukturou ScAdh4, která pro aktivaci musí navázat pouze dva ionty Zn, oproti ScAdh1, která pro aktivaci své tetramerní struktury potřebuje 4 ionty Zn (Bird et al., 2006). ScAdh4 je jediný izoenzym ScAdh, který je podobný železo vázající Adh *Zymomonas mobilis* (Neale et al., 1986), ačkoliv po purifikaci ScAdh4 bylo zjištěno, že je tento izoenzym aktivován pouze ionty  $\text{Zn}^{2+}$ , ale ionty  $\text{Fe}^{2+}$  nikoliv (Drewke a Ciriacy, 1988, Gaona-López et al., 2016).

Další izoenzym ScAdh5 byl poprvé identifikován při sekvenaci chromosomu II *S. cerevisiae*, je podobný izoenzymům ScAdh1, ScAdh2 a ScAdh3 (Feldmann et al., 1994). Jeho funkce zatím není přesně známa.

Poslední dva známe izoenzymy ScAdh6 a ScAdh7, jsou NADPH-dependentní a patří do skupiny cinnamyl alkohol dehydrogenáz (Cad) (Larroy et al., 2002b). ScAdh6 má pravděpodobně dimerní strukturu a je striktně NADPH-dependentní. Substrátová specifita je širší než u předešlých izoenzymů, váže jak lineární, tak větvené primární alkoholy a aldehydy. Je to jediný izoenzym *S. cerevisiae*, který dokáže redukovat veratraldehyd (3,4- dimethoxybenzaldehyde) *in vivo*, vznikající při oxidaci lignocelulózy u hub. Při „overexpressi“ ScAdh6 dokáže kvasinka přežít v toxických koncentracích tohoto aldehydu (Larroy et al., 2002a). Velmi podobnou funkci má i izoenzym ScAdh7. Tyto izoenzymy se nejspíše účastní syntézy ligninu a „fusel alkoholu“, což je směs alkoholů s hlavní složkou amylalkoholu (Larroy et al., 2002b).

## 2.2 Současná klasifikace NAD(P)-dependentních Adh

Alkohol dehydrogenázy jsou velká skupina enzymů, kterou je možné dělit do tří odlišných super-skupin: dehydrogenázy/reduktázy s dlouhým řetězcem (MDR), s krátkým řetězcem (SDR) a enzymy vázající železo (Reid a Fewson, 1994).

### 2.2.1 MDR skupina

MDR je nadskupinou mnoha proteinových rodin, složených z dehydrogenáz/reduktáz s délkou kolem 350 aminokyselin. Podle struktury a funkce se dělí do odlišných skupin. Jsou zde

zahrnuty enzymy dimerní a tetramerní, Adh obsahující atomy zinku, ale také enzymy bez katalytického atomu zinku. (Jörnvall et al., 2001). MDR skupina obsahuje enzymy s dvěma doménami. Na C-terminálním konci se nachází tzv. Rossmannův fold, který váže koenzym (Rao a Rossmann, 1973). Rossmannův fold je složen z šesti paralelních beta listů a dvou alfa helixů na každé straně. Tato struktura má hydrofobní jádro a několik zachovaných klíčových aminokyselin a tvoří tak konzervovanou sekvenci, která se nachází u různých rodin proteinů. Pomocí těchto klíčových aminokyselin je udržována celistvost této trojrozměrné struktury (Taneja a Mande, 1999). N-terminální doména váže substrát, strukturní složení této domény je homologní s GroES strukturou (Taneja a Mande, 1999). Struktura GroES je nepravidelná struktura  $\beta$ -barelů, která byla nalezena ve čtyřech různých skupinách proteinů: chinon oxidoreduktázy, alkohol dehydrogenázy, glukóza dehydrogenázy a chaperonin-10 (Murzin, 1996). Jednotlivé rodiny v MDR skupině jsou rozdělené podle sekvenčních podobností. Jedny z největších proteinových rodin jsou v MDR skupině Adh a Cad (cinnamyl dehydrogenázy). Jednotlivé zastoupení v rodinách proteinů ale nekoreluje s významností jejich funkčnosti. Početnost různých rodin proteinů ale stále stoupá, jelikož jsou objevovány nové druhy proteinů a celkové rozdělení se v budoucnu bude měnit. Rodina proteinů Adh zahrnuje živočišné Adh, rostlinné Adh a glutathion-dependentní formaldehyd dehydrogenázy (Fadh) (Persson et al., 2008), která je nejspíše předkem celé skupiny Adh (Cañestro et al., 2002). Tadh je rodina proteinů kam patří Adh tetramerní, která se nachází u *S. cerevisiae* (Jörnvall, 1977).

### 2.2.2 SDR skupina

Tato skupina enzymů se vyskytuje nejhojněji, objevuje se především v prokaryotických organismech a je velmi různorodá ve své funkci a substrátové specifitě (Jörnvall et al., 2013). Poprvé byla purifikována SDR-Adh z *Drosophila Melanogaster* v roce 1968 (Sofer William a Heinrich, 1968). Jedná se o NAD(P)H-dependentní enzymy s velikostí ~250 aminokyselin na jednu podjednotku, katalyzující oxidoredukční reakce. V této skupině nebyly detekovány žádné železné Adh (Jörnvall et al., 1981). N-terminální konec váže koenzym NAD(P)H, na C-terminálním konci se nachází vazebné místo pro substrát (Jörnvall et al., 1995). Oproti MDR skupině má díky dřívějšímu objevení vyšší početnost, pomocí „screeningu“ který se prováděl u mnoha mikroorganismů, bylo zjištěno, že SDR skupina se objevila dříve než MDR skupina (Jörnvall et al., 2010), čemuž nasvědčuje pár základních rozdílů: SDR skupina má jednodušší strukturu oproti MDR skupině, má také vyšší zastoupení u prokaryot, než je tomu u MDR skupiny, genotyp SDR skupiny je třetím nejvíce rozšířený v náhodném „screeningu“ mnoha organismů (Venter, 2004). SDR skupina fylogeneticky vykazuje divergenci evolučně

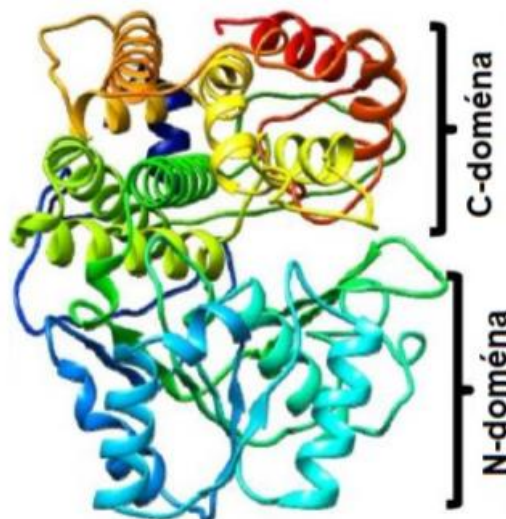


starší než u MDR skupiny (Jörnvall et al., 2013). SDR skupina má pět hlavních skupin: „klasické“ s délkou podjednotky ~250 aminokyselin a „prodloužené“, které mají na C-terminálním konci o ~100 aminokyselin více. Další tři skupiny „střední“, „divergentní“ a „komplexní“ jsou rozděleny podle rozdílných sekvenčních motivů (Kallberg et al., 2002).

### 2.2.3 Železo dependentní ADH

Jedná se o třetí skupinu ze současné klasifikace Adh, tzv. železné Adh (FeAdh). Je to nejméně prozkoumaná skupina Adh ze všech tří skupin (Gaona-López et al., 2016). Poprvé byla purifikována FeAdh *Zymomonas mobilis* v roce 1981 (Wills et al., 1981). Na rozdíl od MDR a SDR skupiny nemá FeAdh takové množství homologů. Možné homology jsou glycerol-1-fosfát dehydrogenáza (Han et al., 2002) a dehydrochinát syntáza (Nichols et al., 2004). Podle NCBI databáze konzervovaných domén spadá FeAdh do skupiny DHQ-FeAdh proteinů, která je složena ze 4 rodin: rodina dehydrochinát syntáz, které katalyzují přeměnu 3- deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát (DAHP) na dehydrochinát (DHQ), rodina glycerol-1-fosfát dehydrogenáz a příbuzných proteinů, rodina glycerol dehydrogenáz a rodina železných alkohol dehydrogenáz (FeAdh). Rodina FeAdh je rozdělena opět pomocí NCBI databáze konzervovaných domén (Marchler-Bauer et al., 2014) do 19 dalších podskupin proteinů podle sekvenční podobnosti a různé metabolické funkce. Všechny FeAdh mají dvě domény, které jsou od sebe odděleny prohlubeninou. Na N-terminálním konci se nachází Rosmannův fold, kde se váže koenzym NAD(P)<sup>+</sup>. C-terminální konec je tvořen devíti  $\alpha$  helixy, kde se nachází vazebné místo pro železo. Tato základní struktura je konzervovaná ve všech podskupinách FeAdh a také ve všech příbuzných rodinách DHQ-FeAdh, model struktury je zobrazen na obrázku 6. V FeAdh je vázán dvojmocný kov M<sup>2+</sup>, který je v tetrahedrál ní koordinaci skrz interakci iontových dipólů s konzervovanými aminokyselinami Asp 242, His 246, His 330 a His 357 (u lidské FeAdh) (Gaona-López et al., 2016). Ačkoliv jsou FeAdh nazývány jako železné Adh, jsou tyto enzymy aktivovány širokou škálou dvojmocných kationtů, mezi kterými je i železo, zinek, nikl, magnesium, měď, kobalt nebo mangan (Sulzenbacher et al., 2004, Elleuche et al., 2013, Extance et al., 2013). V eukaryotech má hlavní zastoupení podskupina FeAdh hydroxykyselina-oxokyselina transhydrogenáza (HOT). Všechny FeAdh u živočichů

jsou právě z podskupiny HOT, houby mají zastoupení HOT FeAdh 80% u rostlin se nevyskytují vůbec (Gaona-López et al., 2016).



Obrázek 6. Model struktury FeAdh u člověka, tento enzym patří do podskupiny HOT, podle Gaona-López et al., 2016.

### 3 PARAZITICKÁ PROTISTA A JEJICH ADH

#### 3.1 *Trichomonas vaginalis*

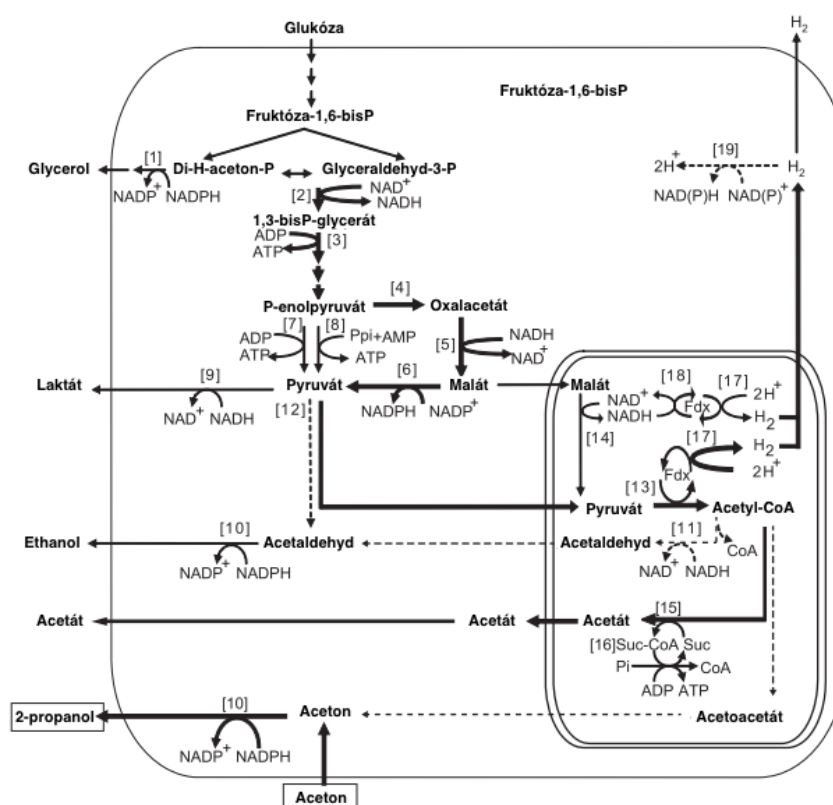
*T. vaginalis* patří mezi bičíkatá Protozoa, parazitující v pohlavním a močovém ústrojí člověka. Způsobují onemocnění trichomoniázu, která je celosvětově nejrozšířenější léčitelnou pohlavní chorobou (World Health Organisation, 2008). Tato nemoc způsobuje vaginitidu a uretritidu u 50 % nakažených žen, u 10 % nakažených mužů se může objevit mukopurulentní uretrální výtok nebo dysurie (Schwebke a Burgess, 2004). V poslední době bylo zjištěno, že jsou infekce *T. vaginalis* spojeny se závažnějšími onemocněními, jako například rakovina prostaty, děložního čípku, souvisí také s vyšší pravděpodobností potratu a zvýšené náchylnosti na infekci HIV (Bachmann et al., 2011).

Energetický metabolismus *T. vaginalis* je založen na anaerobní fermentaci glukózy na glycerol, pyruvátu na malát a další glykolytické dráhy (Müller, 2003). Pomocí cytosolické laktát dehydrogenázy je malé množství pyruvátu přeměněno na laktát, většina laktátu je společně s malátem transportována do hydrogenosomu. Pyruvát je v hydrogenosomu oxidativně dekarboxylován pomocí pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (PFOR) na oxid uhličitý a acetyl-CoA. Acetyl-CoA je následně přeměněn na acetát za současné syntézy ATP pomocí fosforylace

na substrátové úrovni. Ferredoxin transportuje uvolněné elektrony během této dráhy na hydrogenázy, které tvoří molekulární vodík (Hrdý, 2008). NAD-dependentní malic enzym katalyzuje oxidativní dekarboxylaci malátu na pyruvát a oxid uhličitý. Vzniklé NADH je reoxidováno NADH dehydrogenázou (Hrdý et al., 2004), vzniklé elektrony jsou opět přeneseny ferredoxinem pro tvorbu molekulárního vodíku. Plynný vodík je konečným produktem, který je uvolňován do buňky (Šuťák et al., 2012).

U *T. vaginalis* byla podrobněji studována Zn-dependentní sekundární alkohol dehydrogenáza (*Tv-S-Adh*), která katalyzuje přeměnu ketonů, jako například aceton na 2-propanol, který se řadí do sekundárních alkoholů (Ramachandriya et al., 2011). Bylo zjištěno, že při přidání exogenního acetonu dochází k účinné přeměně na 2-propanol, dochází k ovlivnění metabolických drah a ke změně koncových produktů hydrogenosomů, zobrazeno na obrázku 7. Snížení produkce plynného vodíku a zvýšení produkce acetonu, naznačuje, že elektrony produkované hydrogenosomem udržují cytosolickou redoxní rovnováhu. Produkce ethanolu a sekundárních alkoholů je tedy zajištěna *Tv-S-Adh* se specifickým koenzymem NADPH, která je lokalizována v cytosolu (Šuťák et al., 2012).

*Tv-S-Adh* má substrátovou specifitu především na aceton a 2-butanol. V cytosolu tohoto parazita je jedním z nejhojnějších enzymů. Kromě glykolytického zdroje NADPH v cytosolu se hydrogenosom jeví jako zásobárna elektronů pro buňku. Hydrogenosom tedy ovlivňuje redoxní rovnováhu v buňce a tím zvyšuje metabolickou variabilitu parazita, což může být důležité pro rychlou odpověď na změnu prostředí, ve kterém se nachází a také k rychlé adaptaci na nové prostředí (Šuťák et al., 2012).



Obrázek 7. Efekt přeměny acetonu na 2-propanol na hlavní metabolické dráhy v cytosolu a hydrogenosomu *T. vaginalis*. 1, Glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (NADP-dependentní); 2, Glyceraldehydfosfát dehydrogenáza; 3, 3-fosfoglycerát kináza; 4, Fosfoenolpyruvát karboxykináza (GDP-dependentní); 5, Malát dehydrogenáza; 6, Malát dehydrogenáza (dekarboxylace, NADP-dependentní); 7, Pyruvát kináza; 8, Pyruvát dikinázy; 9, Laktát dehydrogenáza; 10, Sekundární alkohol dehydrogenáza; 11, Acetaldehyd dehydrogenáza (CoA-acetylase); 12, Pyruvát dekarboxyláza; 13, Pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza; 14, Malát dehydrogenáza (dekarboxylace, NAD-dependentní); 15, Acetát:sukcinát CoA transferáza; 16, Sukcinyl CoA syntetáza; 17, Hydrogenáza; 18, NADH dehydrogenáza; 19, Hydrogenáza NAD(P)-dependentní; plné šipky ukazují navýšení metabolického toku při zvýšení externího acetonu, přerušované šipky ukazují hypotetické cesty. Podle Šuťák et al., 2012.

### 3.2 Naegleria gruberi/fowleri

Rod *Naegleria* spadá do skupiny améboflagelátů, obsahuje řadu druhů (De Jonckheere a Brown, 1998), vyskytující se na všech kontinentech, kromě Antarktidy, ve sladkovodních jezerech, řekách, bahně a bažinách bohatých na organické látky (De Jonckheere, 2004). Nejznámějším parazitickým druhem, je *Naegleria fowleri*, způsobující primární amébovou meningoencefalitidu (PAM) u člověka, která vede téměř vždy ke smrti. Případy tohoto onemocnění se vyskytují po celém světě, především u plavců v teplých vodách,

ve kterých se parazit vyskytuje. Parazit je schopen pomocí infekce nosu vniknout až do mozku a dalších orgánů, kde způsobuje záněty a masivní tkáňovou nekrózu (De Jonckheere, 2002). Všechny druhy *Naeglerie* se vyskytují ve třech stádiích: cysta, améba a flagelární stádium. Améba je vegetativní forma schopna buněčného dělení bez jaderného dělení ani dělení centrioly, cysta a flagelární forma nejsou schopny dělení. Cysty mají celulózovou schránku s póry, kterými améba excystuje a vytváří opět vegetativní stádium. Flagelární stádium je dočasné a vrací se zpět do formy améby (Fulton, 1993).

*Naegleria gruberi* není patogenní, živí se bakteriemi pomocí fagocytózy. Je blízce příbuzná *N. Fowleri*. *N. gruberi*, která byla osekvenována (Fritz-Laylin et al., 2010), se stala modelovým organismem pro bezpečný výzkum metabolismu *N. fowleri* (Opperdoes et al., 2011).

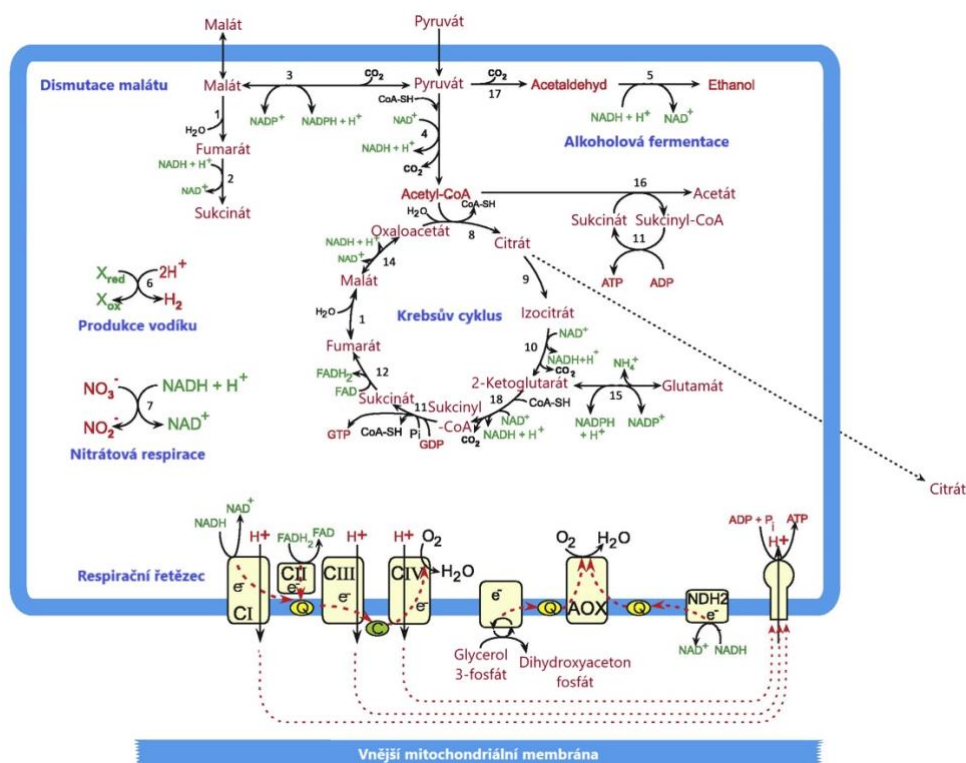
Podle známého genomu se předpokládá, že *N. gruberi* obsahuje flexibilní mitochondrii, která je schopna jak aerobního metabolismu, tak anaerobního metabolismu. Flexibilní metabolismus byl nalezen například i u řasy *Chlamydomonas*, vyskytující se v podobném prostředí jako volně žijící *N. gruberi*. Protista nejspíše využívají metabolickou flexibilitu v hypoxiích, které mohou nastat například v bahnitém prostředí (Mus et al., 2007).

V genomu *N. gruberi* byly nalezeny geny typické pro anaerobní metabolismus: možnost fosforylace na substrátové úrovni, schopnost využití fumarátu jako zdroje elektronů a také gen kódující Fe-hydrogenázu, která je typická pro anaerobní nebo mikroaerofilní organismy a která produkuje molekulární vodík (Vignais a Billoud, 2007). Jedná se o enzym citlivý na kyslík s N-terminální presekvenčí, která ho směřuje pravděpodobně do mitochondrie (Fritz-Laylin et al., 2010). Později bylo ale zjištěno, že je tento enzym aktivní v cytosolu (Tsaousis et al., 2014). V nepřítomnosti kyslíku je problém s reoxidací cytosolické NADH produkované glykolýzou. Laktátová fermentace je málo pravděpodobná, protože se zde nachází laktát dehydrogenáza, která je specifická spíše pro D-enantiomery než L-enantiomery a účastní se nejspíše degradace mureinu z bakteriální buněčné stěny, které améba fagocytuje. Alkoholová fermentace nejspíš není také schopna reoxidace cytosolické NADH, jelikož se předpokládá že alkohol dehydrogenáza *N. gruberi* je lokalizována v mitochondrii (Opperdoes et al., 2011). Adh *N. gruberi* se pravděpodobně řadí do železných Adh, její aktivita je ovlivněna koncentrací železa v prostředí, ve kterém se parazit nachází (Mach et al., 2018). Teoretická mapa mitochondriálního metabolismu je zobrazena na obrázku 8.

*N. gruberi* je schopna oxidovat glukózu, aminokyseliny a mastné kyseliny pomocí Krebsova cyklu, jsou zde přítomny enzymy větveného dýchacího řetězce, který využívá kyslík jako koncový akceptor elektronů (Fritz-Laylin et al., 2010). *N. gruberi* exprimuje všechny enzymy účastnící se glykolýzy, ale metabolická dráha glykolýzy se liší od klasické eukaryotické

(Fritz-Laylin et al., 2010). Enzym hexokináza je obvykle prvním enzymem glykolýzy. U *N. gruberi* je ale místo hexokinázy přítomna homologní glukokináza, která je specifická pro glukózu a nefosforyluje jiné hexózy, to zajišťuje oddělená fruktokináza. Druhá fosforylace v glykolytické dráze je katalyzována namísto obvyklé ATP-dependentní fosfofruktokinázy (PFK), pyrofosfát-Ppi-dependentní PFK (Opperdoes et al., 2011). V posledním kroku glykolýzy je přítomna jak klasická pyruvát kináza, tak pyruvát-fosfát dikináza (PPDK) katalyzující přeměnu fosfoenolpyruvátu na pyruvát, využívající Ppi (pyrofosfát) a AMP, namísto ADP (Bringaud et al., 1998). PPDK společně s Ppi-dependentní PFK, jsou využívány pravděpodobně při glukoneogenezi, souvisí také se zvýšenou aktivitou energetického metabolismu, tedy se zvýšením koncentrace ATP v buňce (Opperdoes et al., 2011).

Podle obsažených enzymů v mitochondrii je tedy předpokládáno že je *N. gruberi* schopna žít jak v anaerobním, tak v aerobním prostředí. Rod *Naegleria* obsahuje aerobní druhy, v hlubokých sedimentech, které jsou typicky anaerobním prostředím, byl ale nalezen i blíže neurčený zástupce rodu *Naegleria* (Kofoed, 1915). Je zde tedy předpoklad možnosti anaerobního života, který ale experimentálně zatím nebyl potvrzen.



Obrázek 8. Teoretická mapa mitochondriálního metabolismu *N. gruberi*, která byla vytvořena na základě osekvenovaného genomu. GTP, guanosin-trifosfát; GDP, guanosin-difosfát; FAD, flavin adenin dinukleotid; FADH<sub>2</sub>, redukovaná FAD; Enzymy: 1, fumarát hydratáza; 2, NADH-dependentní fumarát reduktáza; 3, malát dehydrogenáza (dekarboxilující); 4, pyruvát

dehydrogenáza; 5, alkohol dehydrogenáza; 6, Fe-hydrogenáza; 7, nitrát reduktáza; 8, citrát syntáza; 9, akonitáza; 10, isocitrát dehydrogenáza; 11, sukcinát-CoA syntetáza; 12, sukcinát dehydrogenáza; 14, malát dehydrogenáza (mitochondriální); 15, glutamát dehydrogenáza; 16, acetát:sukcinát CoA-ransferáza; 17, pyruvát dekarboxyláza; 18, 2-oxoglutarát dehydrogenáza. Upraveno podle Oppendoes et al., 2011.

### 3.3 *Entamoeba histolytica*

*E. histolytica* je střevní protozoální parazit, způsobující závažnou amébozu neboli měňavkovou úplavici u člověka. Infekce může mít asymptomatický, ale také závažnější průběh, a to amébovou kolitidu doprovázenou průjmami nebo jaterními abscesy. Je jednou z nemocí způsobující vysoké procento úmrtí na celém světě, onemocnění lze ale léčit nitroimidazolem. (Ghosh et al., 2019).

*E. histolytica* má dvě stádia životního cyklu: cystu a trofozoita. Infekce začíná požitím cysty, v potravě nebo vodě, které jsou kontaminovány fekáliemi. Cysta se dostává přes žaludek do střev, kde se mění v invazního trofozoita, který dokáže proniknout ochranným hlenem ve střevech a infikovat střeva a další orgány (Wu a Freiman, 2017).

*E. histolytica* žije v mikroaerofilním a hypoxickém prostředí lidského střeva (Gillin a Diamond, 1981). Při infekci člověka se patogen pohybuje v prostředích trávicí soustavy s různou koncentrací glukózy (Ferraris et al., 1990), čemuž se parazit přizpůsobuje regulací jeho metabolismu. *E. histolytica* postrádá mitochondrie uzpůsobené aerobnímu metabolismu, místo nich má mitosomy (Tovar et al., 1999). Enzymy Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace nebyly v genomu detekovány. Naopak je schopna aktivně katabolizovat glukózu fermentativní glykolýzou a produkovat ATP. Také byl objeven anorganický pyrofosfát Ppi-dependentní enzym, který využívá vysokoenergetickou fosfátovou skupinu Ppi (pyrofosfát) namísto ATP. Za fyziologických podmínek je schopna reverzibility většiny metabolických drah (Saavedra et al., 2019).

V genomu *E. histolytica* je kódováno množství alkohol a aldehyd dehydrogenáz (EhAdh). První charakterizovanou EhAdh je NADP-dependentní EhAdh1 (Reeves et al., 1971), která je podobná již zmíněné *Tv-S-Adh*, má zvýšenou afinitu pro sekundární alkoholy a je lokalizována pravděpodobně v cytosolu, další funkce zatím není známa (Kumar et al., 1992).

Fermentace je zajištěna NADH-dependentní EhAdh2 s dvojí funkcí (Lo a Reeves, 1978), N-terminální doména zajišťuje aldehyd dehydrogenázovou aktivitu, C-terminální doména alkohol dehydrogenázovou aktivitu s vazebným místem pro  $\text{Fe}^{2+}$ , jedná se tedy o železnou alkohol dehydrogenázu (Espinosa et al., 2001). Její funkcí je pravděpodobně produkce

koncového ethanolu z glykolýzy a regenerace  $\text{NAD}^+$ , to je zajištěno právě dvojitou funkcí EhAdh2, která redukuje acetyl-CoA na hemiacetal vázaný na enzym, který je hydrolyzován na acetaldehyd a dále redukován na ethanol, za současné regenerace  $\text{NAD}^+$ . Pokud by byla EhAdh2 schopna pracovat v reverzním směru, bylo by možné produkovat energii a acetyl-CoA z ethanolu v aerobním prostředí (Pineda et al., 2010). EhAdh2 je pravděpodobně železná Adh, která má také funkci v importu železnatých iontů (Reyes-López et al., 2011), pokud tedy není parazit v prostředí s dostatečnou koncentrací železnatých iontů dochází k narušení celé fermentativní dráhy a životaschopnosti organismu (Espinosa et al., 2009). Enzym EhAdh2 je příbuzný bakteriálnímu enzymu *E. coli* a předpokládá se, že tedy došlo k laterálnímu genovému přenosu z bakterie do parazita (Rosenthal et al., 1997). Podobnou EhAdh2 mají paraziti *Cryptosporidium* a *Giardia intestinalis*, což jsou také střevní paraziti živočichů a člověka (Sanchez L.B., 1998).

Další nalezenou alkohol dehydrogenázou je NADP-dependentní EhAdh3, která na rozdíl od EhAdh2 nevyžaduje pro svou aktivitu železnaté ionty. Nehraje důležitou roli v produkci ethanolu, nicméně je její role v glykolýze stále zkoumána (Rodríguez et al., 1996). EhAdh3 je pravděpodobně lokalizována na povrchu trofozoitů, u *E. histolytica* byla sledována vyšší aktivita tohoto enzymu, u příbuzného druhu *E. dispar* je aktivita EhAdh3 menší a to by také mohlo souviset s vyšší virulencí trofozoita u druhu *E. histolytica* oproti *E. dispar* (Davis et al., 2009).

### 3.4 Cryptosporidium

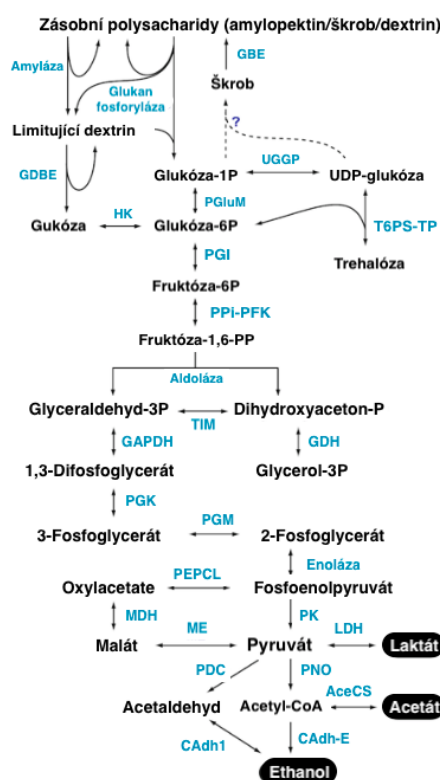
*Cryptosporidium* je střevní protozoální parazit, se širokou hostitelskou specifikou. Infekce tímto parazitem způsobuje kryptosporidíózu, která je druhou světově nejrozšířenější nemocí způsobující průjem. Je smrtelným onemocněním pro děti do pěti let, převážně v rozvojových zemích (Kotloff et al., 2013).

*Cryptosporidium* spadá do skupiny apikomplexa, životní cyklus se skládá z 6 základních stádií: excystace (uvolnění infikujícího sporozoita), merogonie (nepohlavní množení), gametogonie (tvorba makro a mikrogamet), fertilizace (spojení mikro a makrogamet), oocysta (rezistentní stádium infikující další hostitele), sporogonie (množení infekčních sporozoitů) (Current a Garcia, 1991).

Analýza genomu zjistila, že oproti většině apikomplex má *Cryptosporidium* velmi zjednodušený metabolismus a buněčnou strukturu (Khan et al., 2018). Energetický metabolismus je založen především na glykolýze, je schopen fungovat jak v aerobním tak anaerobním prostředí (Barta a Thompson, 2006). V genomu byly nalezeny také geny kódující



enzymy, účastníci se fermentace, které produkují tři konečné produkty glykolýzy organického původu, aby se zamezilo hromadění pyruvátu a acetyl-CoA na konci glykolýzy. Konečné produkty glykolýzy zahrnují laktát produkovaný laktát dehydrogenázou, acetát produkovaný acetyl-CoA syntetázou a alkohol produkovaný alkohol dehydrogenázou (CA<sub>dh</sub>-E), která je podobná EhAdh2 s dvojí funkcí, využívající acetyl-CoA jako substrát pro tvorbu alkoholu, může být také využívána alkohol dehydrogenáza (CA<sub>dh</sub>1), která má pouze jednu funkci a je sdružena s pyruvát dekarboxylázou (Zhang et al., 2012). Karbohydrátová metabolická mapa je ukázána na obrázku 9.



Obrázek 9. Karbohydrátový metabolismus u *Cryptosporidium*, zprostředkovaný glykolytickými a fermentativními enzymy: GBE, enzym větveného glykogenu; GDBE, enzym nevětveného glykogenu; UGGP, UDP-galaktóza/glukóza pyrofosforyláza; HK, hexokináza; PGluM, fosfoglukóza mutáza; T6PS-TP, trehalóza-6-fosfát syntáza-theralóza fosfatáza; PGI, fosfoglukóza izomeráza; PPI-PFK, pyrofosfát-dependentní fosfofruktokináza; TIM, triózaofosfát izomeráza; GAPDH, glyceraldehyd fosfát izomeráza; PGK, fosfoglycerát kináza; PGM, fosfoglycerát mutáza; PEPCL, fosfoenolpyruvát karboxyláza; MDH, malát dehydrogenáza; ME, malic enzym; GDH, glycerol fosfát dehydrogenáza; PK, pyruvát kináza; LDH, laktát dehydrogenáza; PNO, pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza; PDC, pyruvát dekarboxyláza; AceCS, acyl-CoA syntetáza; CA<sub>dh</sub>1, alkohol dehydrogenáza 1 (jedna funkce); CA<sub>dh</sub>-E, alkohol dehydrogenáza (dvě funkce), podle Cacciò a Widmer, 2013.

### 3.5 *Giardia intestinalis*

Jedná se o střevního parazita, způsobujícího průjemové onemocnění u ptáků, plazů a savců včetně člověka. Důvod nákazy je především požití kontaminované vody cystami tohoto parazita. V kyselém prostředí trávicí soustavy dochází k excystaci a přeměnu na trofozoita, který se množí v oblasti tenkého střeva a způsobuje průjem (Adam, 2001).

Podobně jako u *E. histolytica* postrádajícího mitochondrie, je hlavním zdrojem energie anaerobní fermentace karbohydrátů v cytoplasmě. Tento proces je rozdělen do dvou částí. V první části probíhá glykolýza, ze které vzniká pyruvát a ATP. V druhé části se pomocí pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy dekarboxyluje pyruvát a vzniká CO<sub>2</sub> a acetyl-CoA, který je využíván k tvorbě ATP pomocí acetyl-CoA syntázy. Acetyl-CoA může být ale také redukován na acetaldehyd a dále na ethanol za současné oxidace NADH na NAD<sup>+</sup>, tato reakce je katalyzována Adh s dvojí funkcí, která je podobná již zmíněné EhAdh2. Tento enzym má acetaldehyd dehydrogenázovou aktivitu zajišťující přeměnu acetyl-CoA na acetaldehyd a alkohol dehydrogenázovou aktivitu zajišťující reverzibilní změnu acetaldehydu na ethanol (Sanchez L.B., 1998). U *G. Intestinalis* byl nalezen ještě druhý enzym GiAdh3, avšak ve stádiu trofozoita nedochází k expresi tohoto enzymu a nebo je tento enzym v tomto stádiu neaktivní, je tedy pravděpodobné, že tento enzym ve stádiu trofozoita nezastává žádnou funkci (Dan a Wang, 2000).

### 3.6 *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* je parazitický prvok, způsobující Chagasovu nemoc. Jeho životní cyklus obsahuje více adaptivních forem. Nejvýznamnějšími jsou trypomastigotní krevní formy a amastigotní vnitrobuněčné formy nacházející se v savčím těle a procyklická forma ve vektoru, kterým je moucha tse-tse (De Souza et al., 2010).

Chagasova nemoc je léčitelná, účinná léčiva jsou pouze dvě nitroheterocyklické sloučeniny: benznidazol (Bz) a nifurtimox (Nfx). Tyto sloučeniny mají ale nežádoucí vedlejší účinky a procento vyléčených případů není vysoké (Urbina a Docampo, 2003). Malé procento vyléčených případů je také důsledkem přirozené rezistence vyskytující se u některých kmenů *T. cruzi* v různých geografických oblastech. Tyto kmeny jsou schopny přežívat v přítomnosti léčiv (Hayes a Wolft, 1990) a bylo zjištěno že tato rezistence může u tohoto parazita i postupně vznikat (Mejia et al., 2012).

Předpokládá se, že tato rezistence by mohla souviset se zvýšenou expresí dvou proteinů u Bz-rezistentních kmenů *T. cruzi*, aldo-keto reduktáza a TcAdh (Garavaglia et al., 2016, Campos et al., 2009, González et al., 2017). Díky kompletně osekvenovanému genomu *T. cruzi* bylo

zjištěno, že se jedná o železnou Adh (El-Sayed et al., 2005), která je lokalizována v mitochondrii v oblasti kinetoplastu. Kinetoplast je specificky uspořádaná mitochondriální DNA, typická pro řád *Trypanosomatida*. TcAdh je součástí skupiny enzymů, které se podílejí na metabolických a respiračních funkcích, zajišťující alternativní adaptaci na změnu prostředí, ve kterém se parazit nachází (Campos et al., 2009).

## 4 BIOTECHNOLOGIE

V posledním desetiletí se díky širokému výzkumu Adh zvýšila pozornost o tyto enzymy. Byly využity například k biosyntéze alkoholů, tato syntéza je prováděna v mírnějších podmínkách, oproti chemické syntéze, na kterou jsou potřeba toxická rozpouštědla nebo činidla (Musa a Phillips, 2011). Ačkoliv mají Adh širokou katabolickou funkci, využití Adh ve velkém měřítku je zatím omezeno dostupností Adh a nízkou rozpustností substrátu ve vodě. Dochází tedy k výzkumu speciálních bezvodých médií, ve kterých by bylo možné lépe rozpustit substrát pro Adh (De Carvalho, 2017).

Adh je využíváno při biosyntéze chirálních farmaceutických intermediátů, ze kterých je možné vyrábět širokou škálu léků: antidepresiva, antiastmatika, léky proti vysokému cholesterolu, trombóze, epilepsii, zvracení i proti rakovině a AIDS. Adh jsou také využívány při produkci čistých chemikálií,  $\gamma$ -Valerolactone, potenciální meziprodukt pro výrobu paliva (Díaz-Rodríguez et al., 2014), (2S,3S)-2,3-butandiol, chemikálie s širokým využitím v průmyslu (Ji et al., 2010), opticky aktivní fenylethanol a jeho deriváty jsou výhodným meziproduktem pro syntézu enantiomerní čistých chemikálií a také léčiv, které by bez enantiomerů mohly mít méně vedlejších účinků (Singh et al., 2012).

Také již zmíněná Tv-S-Adh s kinetickými vlastnostmi a termostabilitou by mohla být využívána například k průmyslové produkci 2-propanolu, využívaného jako rozpouštědlo (Šut'ák et al., 2012).

## ZÁVĚR

V této práci jsou shrnuty znalosti, týkající se alkohol dehydrogenáz u různých druhů organismů a to především u parazitických protist, kde jsou důležitou složkou v metabolických procesech a účastní se adaptace metabolismu na změny hostitelského prostředí. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří základních skupin, ve kterých se nachází množství různých druhů Adh. V organismech je Adh zastoupena většinou v mnoha izoenzymech, které mají odlišnou funkci a také lokalizaci. Základní funkcí je katalýza reverzibilní přeměny alkoholů na aldehydy a

ketony za současné redukce koenzymu  $\text{NAD(P)}^+$ , ale právě díky množství izoenzymů může být jejich funkce mnohem různorodější. Díky pokrokům ve výzkumu se znalosti o Adh rozšířili, je však stále nedostatek informací například o lokalizaci různých druhů Adh, také funkce jsou u méně známých druhů Adh doposud předmětem zkoumání. Klasifikace Adh je stále nedokončena a díky objevům nových druhů i skupin Adh dochází stále ke změnám v klasifikaci.

Problémem je také bezpečnost při zkoumání některých patogenních parazitů, jako je druh *Naegleria fowleri* a *Trypanosoma cruzi*, které jsou smrtelnými parazity člověka. Jejich metabolické aktivity jsou zkoumány především na příbuzných organismech. Například pro *N. fowleri* je modelovým organismem volně žijící *N. gruberi*, ale je již známo, že metabolismus tohoto nepatogenního parazita se značně liší.

Na tuto práci by bylo možné navázat diplomovou prací, která by se mohla zaměřit například na výzkum méně prozkoumaných druhů Adh u parazitických protist, stanovení přesné lokalizace a funkce v metabolických procesech.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

\*Sekundární citace

\***Adam, R. D.** (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 447–475.

**Bachmann, L. H., Hobbs, M. M., Seña, A. C., Sobel, J. D., Schwebke, J. R., Krieger, J. N., McClelland, R. S. a Workowski, K. A.** (2011). *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 160–172.

**Bakker, B. M., Bro, C., Kötter, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P. a Pronk, J. T.** (2000). The mitochondrial alcohol dehydrogenase Adh3p is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **182**, 4730–4737.

**Barta, J. R. a Thompson, R. C. A.** (2006). What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. *Trends Parasitol.* **22**, 463–468.

**Bird, A. J., Gordon, M., Eide, D. J. a Winge, D. R.** (2006). Repression of ADH1 and ADH3 during zinc deficiency by Zap1-induced intergenic RNA transcripts. *EMBO J.* **25**, 5726–5734.

**Bringaud, F., Baltz, D. a Baltz, T.** (1998). Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: Pyruvate, phosphate dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 7963–7968.

**Cacciò, S. M., Widmer, G.** (2013). *Cryptosporidium*: parasite and disease. *Springer Science & Business Media*, 363–366.

**Campos, F. M. F., Liarte, D. B., Mortara, R. A., Romanha, A. J. a Murta, S. M. F.** (2009). Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* **111**, 56–63.

**Cañestro, C., Albalat, R., Hjelmqvist, L., Godoy, L., Jörnvall, H. a Gonzàlez-Duarte, R.** (2002). Ascidian and amphioxus Adh genes correlate functional and molecular features of the ADH family expansion during vertebrate evolution. *J. Mol. Evol.* **54**, 81–89.

**Ciriacy, M.** (1975). Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **29**, 315–325.

**Ciriacy, M.** (1997). Alcohol dehydrogenases. In: Zimmermann, F. K. a Entian, K. D. (eds): Yeast sugar metabolism. *Technomic Pub. Co., Inc.* 213–223.

**Clark, D. P.** (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **63**, 223–234.

**Current, W. L. a Garcia, L. S.** (1991). Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 325–358.

- Dan, M. a Wang, C. C.** (2000). Role of alcohol dehydrogenase E (ADHE) in the energy metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **109**, 25–36.
- Danielsson, O., Atriant, S., Luquet, T., Hjelmqvist, L., Gonzalez-Duartet, R. a Jörnvall, H.** (1994). Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes. *Biochemistry* **91**, 4980–4984.
- Davis, P. H., Chen, M., Zhang, X., Clark, C. G., Townsend, R. R. a Stanley, S. L.** (2009). Proteomic comparison of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* and the role of *E. histolytica* alcohol dehydrogenase 3 in virulence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e415.
- De Bolle, X., Vinals, C., Prozzi, D., Paquet, J., Leplae, R., Depiereux, E., Vandenhoute, J. a Feytmans, E.** (1995). Identification of residues potentially involved in the interactions between subunits in yeast alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **231**, 214–219.
- De Carvalho, C. C. C. R.** (2017). Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* **10**, 250–263.
- De Jonckheere, J. F.** (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* **41**, 309–342.
- De Jonckheere, J. F.** (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist* **155**, 89–103.
- De Jonckheere, J. F. a Brown, S.** (1998). Three different group I introns in the nuclear large subunit ribosomal DNA of the amoeboflagellate *Naegleria*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 456–461.
- \*De Smidt, O., Du Preez, J. C. a Albertyn, J.** (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Res.* **8**, 967–978.
- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U. a Barrias, E. S.** (2010). Review on *Trypanosoma cruzi* : Host cell interaction. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, 1–18.
- Díaz-Rodríguez, A., Borzęcka, W., Lavandera, I. a Gotor, V.** (2014). Stereodivergent preparation of valuable  $\gamma$ - or  $\delta$ -hydroxy esters and lactones through one-pot cascade or tandem chemoenzymatic protocols. *ACS Catal.* **4**, 386–393.
- Drewke, C. a Ciriacy, M.** (1988). Overexpression, purification and properties of alcohol dehydrogenase IV from *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Gene Struct. Expr.* **950**, 54–60.
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G.,**

- Caler, E., Renauld, H., Worthey, E. A., Hertz-Fowler, C., et al.** (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. **309**, 404–409.
- Elleuche, S., Fodor, K., von der Heyde, A., Klippel, B., Wilmanns, M. a Antranikian, G.** (2013). Group III alcohol dehydrogenase from *Pectobacterium atrosepticum*: insights into enzymatic activity and organization of the metal ion-containing region. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4041–4051.
- Espinosa, A., Yan, L., Zhang, Z., Foster, L., Clark, D., Li, E. a Stanley, S. L.** (2001). The bifunctional *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) protein is necessary for amebic growth and survival and requires an intact C-terminal domain for both alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 20136–20143.
- Espinosa, A., Perdrizet, G., Paz-y-Miño C., G., Lanfranchi, R. a Phay, M.** (2009). Effects of iron depletion on *Entamoeba histolytica* alcohol dehydrogenase 2 (EhADH2) and trophozoite growth: implications for antiamoebic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 675–678.
- Extance, J., Crennell, S. J., Eley, K., Cripps, R., Hough, D. W. a Danson, M. J.** (2013). Structure of a bifunctional alcohol dehydrogenase involved in bioethanol generation in *Geobacillus thermoglucosidasius*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2104–2115.
- Fan, F. a Plapp, B. V.** (1999). Probing the affinity and specificity of yeast alcohol dehydrogenase I for coenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**, 240–249.
- Fan, F., Lorenzen, J. A. a Plapp, B. V.** (1991). An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry* **30**, 6397–6401.
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., André, B., Baclet, M. C., Barthe, C., Baur, A., Bécam, A. M., Biteau, N., Boles, E., et al.** (1994). Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *Nature* **371**, 5795–809.
- Ferraris, R. P., Yasharpour, S., Lloyd, K. C., Mirzayan, R. a Diamond, J. M.** (1990). Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **259**, G822–G837.
- Fowler, P. W., Ball, A. J. S. a Griffiths, D. E.** (1971). The Control of alcohol dehydrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Biochem.* **50**, 35–43.
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field,**

- M. C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., et al.** (2010). The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell* **140**, 631–642.
- Fulton, C.** (1993). *Naegleria*: A research partner for cell and developmental biology. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 520–532.
- Gancedo, J. M.** (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 334–361.
- Gaona-López, C., Julián-Sánchez, A. a Riveros-Rosas, H.** (2016). Diversity and evolutionary analysis of iron-containing (Type-III) alcohol dehydrogenases in eukaryotes. *PLoS One* **11**, 1–30.
- Garavaglia, P. A., Laverrière, M., Cannata, J. J. B. a García, G. A.** (2016). Putative role of the aldo-keto reductase from *Trypanosoma cruzi* in benznidazole metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 2664–2670.
- \*Ghosh, S., Padalia, J. a Moonah, S.** (2019). Tissue destruction caused by *Entamoeba histolytica* parasite: cell death, inflammation, invasion, and the gut microbiome. *Curr. Clin. Microbiol. Reports* **6**, 51–57.
- Gillin, F. D. a Diamond, L. S.** (1981). *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*: Effects of cysteine and oxygen tension on trophozoite attachment to glass and survival in culture media. *Exp. Parasitol.* **52**, 9–17.
- González, L., García-Huertas, P., Triana-Chávez, O., García, G. A., Murta, S. M. F. a Mejía-Jaramillo, A. M.** (2017). Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* **106**, 704–718.
- Han, J. S., Kosugi, Y., Ishida, H. a Ishikawa, K.** (2002). Kinetic study of sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *Eur. J. Biochem.* **269**, 969–976.
- Harris, J. I.** (1964): The structure and catalytic activity of thiol dehydrogenases. In: Goodwin, T. W., Harris, J. I., Hartley, B. S. (eds): Structure and activity of enzymes. *Academic Press*. 97-109.
- Hayes, J. D. a Wolff, C. R.** (1990). Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem. J.* **272**, 281–295.
- Hrdý, I., Hirt, R. P., Dolezal, P., Bardónová, L., Foster, P. G., Tachezy, J. a Embley, T. M.** (2004). Trichomonas hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of



- mitochondrial complex I. *Nature* **432**, 618–622.
- Hrdý, I., Tachezy, J. a Müller M.** (2008). Metabolism of trichomonad hydrogenosomes. In: Tachezy, J. (ed): *Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes. Springer-Verlag.* 114-145.
- Ismail, A. A., Zhu, C. X., Colby, G. D. a Chen, J. S.** (1993). Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *J. Bacteriol.* **175**, 5097–5105.
- Ji, X. J., Huang, H., Zhu, J. G., Ren, L. J., Nie, Z. K., Du, J. a Li, S.** (2010). Engineering *Klebsiella oxytoca* for efficient 2, 3-butanediol production through insertional inactivation of acetaldehyde dehydrogenase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1751–1758.
- Jörnvall, H. et al** (1977). The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **72**, 425–442.
- Jörnvall, H., Eklund, H. a Brändén, C. I.** (1978). Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **253**, 8414–8419.
- Jörnvall, H., Persson, M. a Jeffery, J.** (1981). Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the different enzyme activities within each type. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**, 4226–4230.
- Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., González-Duarte, R., Jeffery, J. a Ghosh, D.** (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**, 6003–6013.
- Jörnvall, H., Shafqat, J. a Persson, B.** (2001). Variations and constant patterns in eukaryotic MDR enzymes: Conclusions from novel structures and characterized genomes. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 491–498.
- Jörnvall, H., Hedlund, J., Bergman, T., Oppermann, U. a Persson, B.** (2010). Superfamilies SDR and MDR: From early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **396**, 125–130.
- Jörnvall, H., Hedlund, J., Bergman, T., Kallberg, Y., Cederlund, E. a Persson, B.** (2013). Origin and evolution of medium chain alcohol dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **202**, 91–96.
- Kallberg, Y., Oppermann, U., Jörnvall, H. a Persson, B.** (2002). Short-Chain

- dehydrogenases/reductases (SDR). *Eur. J. Biochem.* **269**, 4409–4417.
- Karlović, D., Amiguet, P., Bonner, F. J. a Luisi, P. L.** (1976). Spectroscopic investigation of binary and ternary coenzyme complexes of yeast alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **66**, 277–284.
- Kato, M. a Lin, S.-J.** (2014). Regulation of NAD<sup>+</sup> metabolism, signaling and compartmentalization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*. **23**, 49–58.
- Khan, A., Shaik, J. S. a Grigg, M. E.** (2018). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* **184**, 1–14.
- Kofoed, C. A.** (1915). On the relative numbers of Rhizopods and Flagellates in the fauna of soils. *Science*. **42**, 937–940.
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S. O., Sur, D., Breiman, R. F., et al.** (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*. **382**, 209–222.
- Kumar, A., Shen, P. S., Descoteaux, S., Pohl, J., Bailey, G. a Samuelson, J.** (1992). Cloning and expression of an NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenase gene of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10188–10192.
- Larroy, C., Fernández, M. R., González, E., Parés, X. a Biosca, J. A.** (2002a). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem. J.* **361**, 163–172.
- Larroy, C., Parés, X. a Biosca, J. A.** (2002b). Characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* NADP(H)-dependent alcohol dehydrogenase (ADHVII), a member of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5738–5745.
- Larsson, C., Pahlman, I., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L. a Gustafsson, L.** (1998). The Importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 347–357.
- Leskovac, V., Trivić, S. a Perčin, D.** (2002). The three zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast. *FEMS Yeast Res.* **2**, 481–494.
- Lo, H.-S. a Reeves, R. E.** (1978). Pyruvate-to-ethanol pathway in *Entamoeba histolytica*.

- Biochem. J.* **171**, 225–230.
- Lutstorf, U. a Megnet, R.** (1968). Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 933–944.
- Mach, J., Bíla, J., Ženíšková, K., Arbon, D., Malych, R., Glavanakovová, M., Nývltová, E. a Šut'ák, R.** (2018). Iron economy in *Naegleria gruberi* reflects its metabolic flexibility. *Int. J. Parasitol.* **48**, 719–727.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., et al.** (2014). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**, 222–226.
- Marres, C. A. M., de Vries, S. a Grivell, L. A.** (1991). Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857–862.
- Mejia, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O. a Kelly, J. M.** (2012). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J. Infect. Dis.* **206**, 220–228.
- Murzin, A. G.** (1996). Structural classification of proteins: new superfamilies. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 386–394.
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M. C. a Grossman, A. R.** (2007). Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **282**, 25475–25486.
- Musa, M. M. a Phillips, R. S.** (2011). Recent advances in alcohol dehydrogenase-catalyzed asymmetric production of hydrophobic alcohols. *Catal. Sci. Technol.* **1**, 1311.
- Müller, M.** (2003). Anaerobic protozoa. In: Marr, J. J., Nilsen T. W. a Komuniecki, R. W. (eds): Molecular medical parasitology. Academic Press. 125–139.
- Neale, A. D., Scopes, R. K., Kelly, J. M. a Wettenhall, R. E. H.** (1986). The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Biochem.* **154**, 119–124.
- Negelein, E. a Wulff, H. J.** (1937). Diphosphopyridinproteid alkohol, acetaldehyd. In: *Biochemische Zeitschrift*, s. 351.
- Nichols, C. E., Ren, J., Leslie, K., Dhaliwal, B., Lockyer, M., Charles, I., Hawkins, A. R. a Stammers, D. K.** (2004). Comparison of ligand-induced conformational changes and domain closure mechanisms, between prokaryotic and eukaryotic dehydroquinase

- synthases. *J. Mol. Biol.* **343**, 533–546.
- Nissen, T. L., Schulze, U., Nielsen, J. a Villadsen, J.** (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **143**, 203–218.
- Opperdoes, F. R., De Jonckheere, J. F. a Tielens, A. G. M.** (2011). *Naegleria gruberi* metabolism. *Int. J. Parasitol.* **41**, 915–924.
- Persson, B., Hedlund, J. a Jörnvall, H.** (2008). The MDR superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3879–3894.
- Pineda, E., Encalada, R., Rodríguez-Zavala, J. S., Olivos-García, A., Moreno-Sánchez, R. a Saavedra, E.** (2010). Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and bifunctional aldehyde-alcohol dehydrogenase are essential for energy metabolism under oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *FEBS J.* **277**, 3382–3395.
- Plapp, B. V, Ganzhorn, A. J., Gould, R. M., Green, D. W., Jacobi, T., Warth, E. a Kratzer, D. A.** (1991). Catalysis by yeast alcohol dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **284**, 241–51.
- Price, V. L.** (2003). Inducible expression cassettes in yeast: ADH2. In *Recombinant Gene Expression Protocols*, **62**, 149–158.
- \*Raj, S. B., Ramaswamy, S. a Plapp, B. V** (2014). Yeast alcohol dehydrogenase structure and catalysis. *ACS Biochem.* **53**, 5791–5803.
- Ramachandriya, K. D., Wilkins, M. R., Delorme, M. J. M., Zhu, X., Kundiyana, D. K., Atiyeh, H. K. a Huhnke, R. L.** (2011). Reduction of acetone to isopropanol using producer gas fermenting microbes. *Biotechnol. Bioeng.* **108**, 2330–2338.
- Rao, S. T. a Rossmann, M. G.** (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **76**, 241–256.
- \*Reeves, R. E., Montalvo, F. E. a Lushbaugh, S.** (1971). Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-dependent alcohol dehydrogenase : The enzyme *Entamoeba histolytica* and come enzyme inhibitors. *Int. J. Biochem.* **2**, 55–64.
- Reid, M. F. a Fewson, C. A.** (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 13–56.
- Reyes-López, M., Bermúdez-Cruz, R. M., Avila, E. E. a De La Garza, M.** (2011). Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*. *Microbiology* **157**, 209–

219.

- Rodríguez, M. A., Báez-Camargo, M., Delgadillo, D. M. a Orozco, E.** (1996). Cloning and expression of an *Entamoeba histolytica* NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1306**, 23–26.
- Rosenthal, B., Mai, Z., Caplivski, D., Ghosh, S., De La Vega, H., Graf, T. a Samuelson, J.** (1997). Evidence for the bacterial origin of genes encoding fermentation enzymes of the amitochondriate protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Bacteriol.* **179**, 3736–3745.
- Ryde, U.** (1995). On the role of Glu-68 in alcohol dehydrogenase. *Protein Sci.* **4**, 1124–1132.
- Saavedra, E., Encalada, R., Vázquez, C., Olivos-García, A., Michels, P. A. M. a Moreno-Sánchez, R.** (2019). Control and regulation of the pyrophosphate-dependent glucose metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **229**, 75–87.
- Sanchez L.B.** (1998). Aldehyde dehydrogenase (coA-acetylating) and the mechanism of ethanol formation in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 57–64.
- Schwebke, J. R. a Burgess, D.** (2004). Trichomoniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 1–9.
- Sekhar, V. C. a Plapp, B. V.** (1990). Rate constants for a mechanism including intermediates in the interconversion of ternary complexes by horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **29**, 4289–4295.
- Singh, A., Chisti, Y. a Banerjee, U. C.** (2012). Stereoselective biocatalytic hydride transfer to substituted acetophenones by the yeast *Metschnikowia koreensis*. *Process Biochem.* **47**, 2398–2404.
- Sofer William a Ursprung, H.** (1968). *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **243**, 3110–3115.
- Sulzenbacher, G., Alvarez, K., Van Den Heuvel, R. H. H., Versluis, C., Spinelli, S., Campanacci, V., Valencia, C., Cambillau, C., Eklund, H. a Tegoni, M.** (2004). Crystal structure of *E. coli* alcohol dehydrogenase YqhD: Evidence of a covalently modified NADP coenzyme. *J. Mol. Biol.* **342**, 489–502.
- Sund, H. a Theorell, H.** (1963). Alcohol dehydrogenases. In: *The Enzymes* 2nd ed. Academic Press. **7**, 25–83.
- Štuřák, R., Hrdy, I., Dolezal, P., Cabala, R., Sedinová, M., Lewin, J., Harant, K., Müller, M. a Tachezy, J.** (2012). Secondary alcohol dehydrogenase catalyzes the reduction of

- exogenous acetone to 2-propanol in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS J.* **279**, 2768–2780.
- Taneja, B. a Mande, S. C.** (1999). Conserved structural features and sequence patterns in the GroES fold family. *Protein Eng. Des. Sel.* **12**, 815–818.
- Tovar, J., Fisher, A. a Clark, C. G.** (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Mol. Microbiol.* **32**, 1013–1021.
- Tsaousis, A. D., Nývltová, E., Šuták, R., Hrdý, I. a Tachezy, J.** (2014). A Nonmitochondrial hydrogen production in *Naegleria gruberi*. *Genome Biol. Evol.* **6**, 792–799.
- Urbina, J. A. a Docampo, R.** (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**, 495–501.
- Venter, J. C.** (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science.* **304**, 66–74.
- \*Vignais, P. M. a Billoud, B.** (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* **107**, 4206–4272.
- Von Jagow, G. a Klingenberg, M.** (1970). Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* **12**, 583–592.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P. a Hol, W. G. J.** (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* **187**, 101–107.
- Wills, C., Kratočil, P., Londo, D. a Martin, T.** (1981). Characterization of the two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 775–785.
- World Health Organisation** (2008). Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections 2008. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75181/9789241503839\\_eng.pdf;jsessionid=861CBB4DD31247AAF097E94042D1DDA9?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75181/9789241503839_eng.pdf;jsessionid=861CBB4DD31247AAF097E94042D1DDA9?sequence=1)
- Wu, N. a Freiman, J. S.** (2017). Caecal ulceration in an asymptomatic man. *Gut* **66**, 886–886.
- Yuan, D. S.** (2000). Zinc-regulated genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by transposon tagging. *Genetics* **156**, 45–58.
- Zhang, H., Guo, F., Zhou, H. a Zhu, G.** (2012). Transcriptome analysis reveals unique metabolic features in the *Cryptosporidium parvum* oocysts associated with

environmental survival and stresses. *BMC Genomics* **13**, 1471–2164.

**Zheng, Y.-G., Yin, H.-H., Yu, D.-F., Chen, X., Tang, X.-L., Zhang, X.-J., Xue, Y.-P., Wang, Y.-J. a Liu, Z.-Q.** (2017). Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 987–1001.